

Quin 2 法测定人血小板胞浆游离钙浓度

陆志强 王道生 赵昇皓* 裴林* (苏州医学院药理教研室, 苏州 215007)

摘要 应用荧光钙指示剂Quin2测定胞浆游离钙浓度的方法,研究了在不同胞外游离钙浓度 $[Ca^{2+}]_0$ 下人血小板静息状态时及由凝血酶激活后的胞浆游离钙浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。结果显示:凝血酶可使负载Quin2的人血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 呈现浓度依赖性的短暂升高,且这种作用对 $[Ca^{2+}]_0$ 有明显的依赖性。该项结果提示凝血酶引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高主要来源于外钙内流,部分为内钙释放所致。

关键词 Quin 2 血小板 钙 凝血酶

人血小板胞浆游离钙浓度的变化介导了血小板的活化、分泌等许多的胞内过程,因此研究人血小板胞浆游离钙浓度的变化,对于阐明胞浆游离钙对许多血小板的生理生化及病理过程的参与和调节作用具有重要意义。目前人们已开始广泛采用某些荧光钙指示剂作为研究手段。本文在建立Quin 2法测定胞浆游离钙的基础上研究了凝血酶诱导的人血小板胞浆游离钙浓度的变化。

1 材料和方法

1.1 钙相关性 Quin 2 波长扫描曲线制备^[1]。将Quin2(Sigma, USA)加入超纯水(电阻率 >18.2 M Ω)中使成20 μ mol/L(终浓度),在RF-540型荧

光分光光度计(岛津,日本)上分别作激发波长扫描(固定发射波长为492 nm)和发射波长扫描(固定激发波长为339 nm)。在样品池中逐渐累加 Ca^{2+} ,在一系列递增的钙浓度下作重复波长扫描。

1.2 负载Quin 2的血小板悬液制备^[6]。取健康人静脉血,以2% EDTA 抗凝(1, 6, v/v),经1000 rpm离心10 min后取得富血小板血浆(PRP)。以2000 rpm离心10 min后将沉淀的血小板悬浮于Hepes A液中(mmol/L, NaCl 145, KCl 5, $MgSO_4$ 1, Na_2HPO_4 0.5, Hepes 10, Glucose 5, EDTA 2, BSA 0.35%, pH 6.5)。将再次沉淀的血小板重悬浮于Hepes B液中(mmol/L, NaCl 145,

*徐州医学院生化研究室

KCl 5, MgSO₄ 1, Na₂HPO₄ 0.5, Hepes 10, Glucose 5, pH 7.4), 调整血小板密度至 1×10^8 cells/ml 并加入 Quin 2/AM (Sigma. USA. 溶于二甲亚砜)至终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$, 37°C 孵育 30 min. 用 Hepes B 液洗涤血小板两次以充分洗去胞外残存染料. 最后将血小板悬浮于 Hepes B 液中进行荧光测定. 测定前加入胞外重金属离子络合剂 EDTA (1,2-cyclohexylenedinitrilotetraacetic acid, Aldrich. USA) $10 \mu\text{mol/L}$, 调整胞外游离钙浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_0$ 为 1 mmol/L .

1.3 测定荧光强度. 固定激发波长 339 nm, 发射波长 492 nm, 第一光栅 5 nm, 第二光栅 10 nm, 按时间扫描方式在 RF-540 型荧光分光光度计上测定血小板荧光强度为 F 值. 快速加入不同浓度的凝血酶 (Thrombin, Thr) 后立即记录荧光强度变化. 加入 0.1% Triton X-100 测定最大荧光强度为 F_{max} , 再加入 1 mmol/L MnCl_2 测定荧光强度为 F_{Mn} . 胞浆游离钙浓度计算公式为^[19]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$$

其中: $F_{\text{min}} = F_{\text{Mn}} + 1/6(F_{\text{max}} - F_{\text{Mn}})$

$$K_d = 115 \text{ nmol/L}$$

2 结果

2.1 钙相关的 Quin 2 特征性波长扫描曲线 Quin 2 在不同的游离钙浓度下具有其特征性的激发光谱 (339 nm) 和发射光谱 (492 nm), 表明了 Quin 2 的荧光强度对游离钙浓度的显著依赖性和敏感性 (Fig 1).

2.2 人血小板在 1 mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_0$ 时对凝血酶刺激的胞浆游离钙浓度变化, 在 1 mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_0$ 下, 血小板静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 110 nmol/L . 加入凝血酶后血小板胞浆游离钙浓度迅速上升, 其上升幅度和速度随凝血酶剂量的增加而增强. 在 0.1 U/ml 凝血酶刺激下, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上升增加 7.4 倍 (Tab 1.). 血小板在经历短暂的钙浓度上升高峰后即转入一个需时稍长的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平恢复过程. 在 0.1 U/ml 凝血酶作用 10 min 后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 恢复至原有水平 (Fig 2.).

2.3 人血小板在胞外无钙时对凝血酶刺激的胞浆钙浓度变化, 在胞外无钙条件下, 血小板静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 31 nmol/L , 加入凝血酶后血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有轻度上升, 在 0.1 U/ml 凝血酶下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加 1.4 倍, 并在较短时间内恢复至原有水平 (Tab 2.) (Fig 2.).

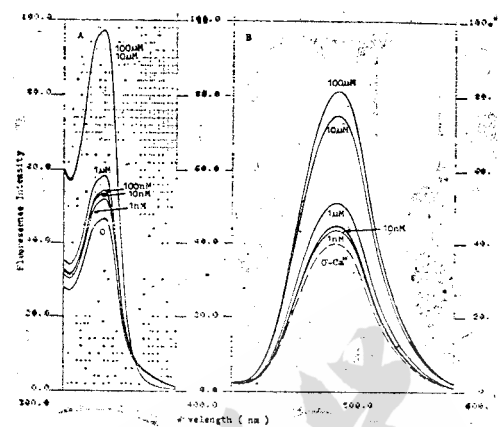


Fig 1. Excitation spectra (A.) and emission spectra (B.) of $20 \mu\text{mol/L}$ Quin 2 with

Tab 1 Calcium transients induced by thrombin at 1 mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_0$ in human platelets.

Thrombin (U/ml)	n	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L)	Rate of change (%)
0	5	110 ± 4	100
0.03	4	271 ± 19	247
0.10	5	805 ± 27	735
0.50	4	1102 ± 92	1006

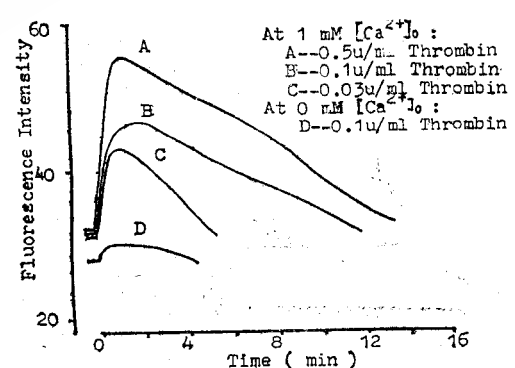


Fig 2. Diagram of thrombin-induced changes of fluorescence intensity at 1 or 0 mmol/L $[\text{Ca}^{2+}]_0$ in human platelets.

Tab 2 Calcium transients induced by thrombin at 0 mmol/L $[Ca^{2+}]_0$ in human platelets.

Thrombin (U/ml)	n	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	Rate of change (%)
0	5	31 ± 3	100
0.1	5	44 ± 4	142

3 讨论

在 1 mmol/L $[Ca^{2+}]_0$ 时, 人血小板静息 $[Ca^{2+}]_i$ 为 110 nmol/L, 而在胞外无钙时的静息 $[Ca^{2+}]_i$ 仅为 31 nmol/L。在存在胞外钙的情况下凝血酶可使 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速上升, 其上升幅度和速度与凝血酶浓度呈现明显的剂量依赖性, 在 0.1 U/ml 凝血酶下 $[Ca^{2+}]_i$ 增加 7.4 倍。而同样浓度的凝血酶仅使在胞外无钙情况下的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加 1.4 倍。以上结果提示: 血小板的静息 $[Ca^{2+}]_i$ 水平与 $[Ca^{2+}]_0$ 水平密切相关, 在胞外无钙时, 血小板不易受到激活。血小板受凝血酶激活时 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高主要依赖于外钙内流, 同时凝血酶引起的内钙释放也参与了一部分的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。

由于 Quin 2/AM 极易负载入细胞, 操作方法简便易行, 测定灵敏度高, 是一种研究细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的有效方法。

REFERENCES

- 1 Tsien RY, et al. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.*, 1982, 94:325
- 2 Rink TJ, et al. Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} -thresholds and Ca^{2+} -independent activation for shape change and secretion. *FEBS Lett.*, 1982, 148:21
- 3 Rink TJ, et al. Using Quin 2 in cell suspensions. *Cell Calcium*, 1985, 6:133
- 4 Mac Intyre DE, et al. Regulation of platelet cytosolic free calcium by cyclic nucleotides and protein kinase C. *FEBS Lett.*, 1985, 188:383
- 5 Pollock WK, et al. Thrombin and ionomycin can raise platelet cytosolic Ca^{2+} to micromolar levels by discharge of internal Ca^{2+} stores: studies using fura-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 139:308
- 6 肖利群等. Quin 2 测定兔血小板胞浆内游离钙浓度. 上海第二医科大学学报, 1989, 9, 138
- 7 姜云飞等. 用荧光钙指示剂奎 2 测定人血小板胞浆游离钙浓度. 第一军医大学学报, 1992, 12, 43

收稿日期: 1992-06-18

Abstract in Brief

Thrombin-induced Cytosolic Free Calcium Transients

Monitored by Quin 2 Method in Human Platelets

Lu Zhiqiang, Wang Daosheng, Zhao Shenghao, Pei Lin

(Department of Pharmacology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

Abstract The effects of thrombin on the level of cytoplasmic free calcium at varying $[Ca^{2+}]_0$ in human platelets were observed with Quin 2 method. The results showed that thrombin raised transiently the platelet cytosolic free calcium concentration in a dose dependent manner and that the effects were significantly dependent on the $[Ca^{2+}]_0$. It indicated that thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was a result mainly of Ca^{2+} influx and partly of internal Ca^{2+} mobilization.

Key words Quin 2 Platelet Calcium Thrombin